

INPI

3

0 RES

18 MARS 1998

PRIORITY DOCUMENT

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

BREVET D'INVENTION

REC'D	01 APR 1998
W/PC	PCT

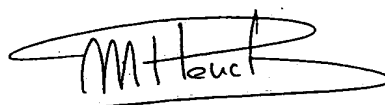
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 04 FEV. 1998

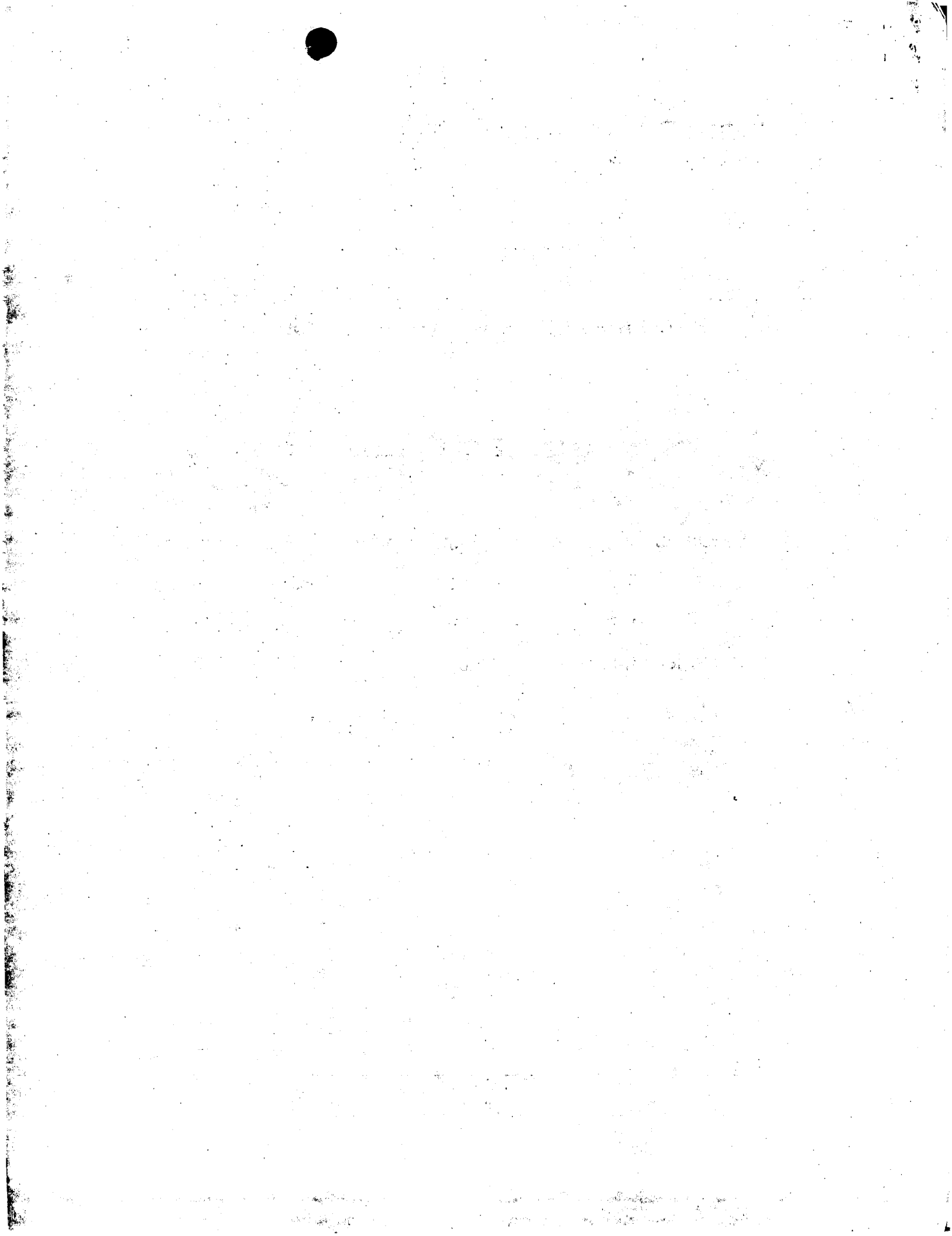
Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département



Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30





BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL DÉPARTEMENT DE DÉPÔT DATE DE DÉPÔT		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
14 JAN 1997 97 00278 - 75 14.1.97		CABINET ORES 6 avenue de Messine 75008 PARIS	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat		n° du pouvoir permanent références du correspondant BLOcp263/26FR date	
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non			
Titre de l'invention (200 caractères maximum) METHODE DE CRIBLAGE DE SUBSTANCES A ACTION THERAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DES ESST COMPRENANT UNE ETAPE D'ISOLEMENT DE LA PrPres, A PARTIR DE LA RATE, PROCEDE D'ISOLEMENT DE LA PrPres ET SES APPLICATIONS.			
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Nationalité (s) française Adresse (s) complète (s) 1-33 rue de la Fédération, 75015 PARIS		code APE-NAF Forme juridique Etablissement public Pays FRANCE	
En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>			
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) Béatrice ORES n° 92-4046		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI	

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9700278

TITRE DE L'INVENTION : METHODE DE CRIBLAGE DE SUBSTANCES A ACTION
THERAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DES ESST
COMPRENANT UNE ETAPE D'ISOLEMENT DE LA PrPres,
A PARTIR DE LA RATE, PROCEDE D'ISOLEMENT DE
LA PrPres ET SES APPLICATIONS.

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

CABINET ORES

6 avenue de Messine
75008 PARIS (FRANCE)

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

DESLYS Jean-Philippe
15 allée des Pelouses, 78170 LA CELLE SAINT CLOUD (FRANCE)


BERINGUE Vincent
INA PG Rose des Vents 22, 78850 THIVERVAL GRIGNON (FRANCE)

LASMEZAS Corinne
97 rue de Crimée, 75019 PARIS (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (~~à compléter par le demandeur~~) du mandataire

Le 14 janvier 1997,


Béatrice ORES
n° 92-4046

La présente invention est relative à une méthode de criblage de substances, susceptibles d'avoir une action thérapeutique dans le traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) ou maladies dites à prions, qui comprend une étape d'isolement de la PrPres, à partir de la rate ; la présente invention est également relative à des procédés d'isolement de la PrPres, particulièrement adaptés à ladite méthode de criblage ainsi qu'à leurs applications, notamment dans la détection de la PrPres.

Les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles sont provoquées par des agents transmissibles non conventionnels (ANTC), encore appelés prions, dont la nature précise demeure inconnue à ce jour. Les ESST comprennent essentiellement la maladie de Creutzfeldt-Jakob, chez l'homme (MCJ ou CJD pour Creutzfeldt-Jakob disease), la tremblante, chez le mouton et la chèvre et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB ou BSE pour *bovine spongiform encephalopathy*), chez les bovins ; d'autres encéphalopathies ont été mises en évidence chez le vison ou certains animaux sauvages, tels que le cerf et l'élan.

Ces maladies sont d'évolution constamment fatale et il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement efficace.

Dans les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, il existe une accumulation d'une protéine de l'hôte, la PrP (ou protéine du prion), sous une forme anormale (PrPres), principalement dans le système nerveux central ; la PrPres copurifie avec l'infectiosité et son accumulation précède l'apparition des lésions histologiques. *In vitro*, elle est toxique pour des cultures de neurones.

Deux propriétés biochimiques permettent de distinguer la PrPres de la PrP normale : la PrPres est partiellement résistante aux protéases et est insoluble dans les détergents non-ioniques, tels que le Triton-X100.

La recherche de nouvelles molécules susceptibles d'être efficaces dans le traitement de ces encéphalopathies se heurte à l'absence aussi bien de modèles *in vitro* performants, qu'à la longueur de la mise en place des modèles expérimentaux *in vivo*, tels que la tremblante expérimentale du hamster (80 à 365 jours) ou la tremblante expérimentale de la souris (180 à 550 jours).

En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à une méthode de criblage efficace et fiable, qui ne présente pas les inconvénients des

modèles expérimentaux actuellement utilisés et qui répond mieux aux besoins de la pratique, notamment en ce que l'évaluation de l'action des substances à tester peut être réalisée en moins de deux mois.

Pour ce faire, les Inventeurs ont trouvé un marqueur fiable et ont mis
5 au point un protocole reproductible.

La présente invention a pour objet une méthode de criblage de substances, susceptibles d'avoir une action thérapeutique dans le traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST ou maladies dites à prions), caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

10 a) inoculation au moment t_A , à au moins un animal de laboratoire (de préférence plusieurs, répartis en lots), par toute voie appropriée, d'un agent transmissible non conventionnel (ATNC) ou prion ;

b) administration audit animal de laboratoire, par toute voie appropriée, soit d'une substance à cribler (animal test), soit d'un placebo (animal contrôle
15 négatif), dans un délai compris entre $t_A - 15$ jours et t_C , correspondant au moment où le taux de PrPres dans la rate dudit animal de laboratoire est maximal ou dans un délai compris entre t_B , correspondant au moment de la première détection de PrPres dans la rate dudit animal de laboratoire et t_C ;

c) sacrifice des animaux dans un intervalle de temps compris entre t_B
20 et t_C , de préférence à t_C et prélèvement de la rate ;

d) isolement de la PrPres à partir des rates prélevées, selon un procédé d'isolement convenable comprenant l'homogénéisation de la rate, suivie d'un traitement de l'homogénat obtenu pour extraire et éventuellement purifier la PrPres ;

e) semi-quantification de la PrPres obtenue à l'étape (d) par détection
25 de ladite PrPres par toute méthode appropriée, produisant un signal spécifique, suivie d'une comparaison du signal obtenu avec une gamme étalon de dilutions d'un contrôle positif constitué d'un homogénat de cerveau d'un animal au stade terminal de la maladie ; et

f) sélection de la substance criblée comme candidat au traitement des
30 encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, si le taux de PrPres obtenu dans la rate de l'animal test, à l'étape e) est diminué d'au moins un facteur 2, par rapport au taux obtenu dans les mêmes conditions avec l'animal contrôle négatif.

Les temps t_A , t_B et t_C sont exprimés en jours ; $t_A = J0$.

En effet, les Inventeurs ont trouvé, de manière inattendue, que les substances qui augmentent la survie d'animaux infectés, quelle que soit la voie d'inoculation (périphérique ou intracérébrale), entraînent un retard parallèle dans l'accumulation de la PrPres au niveau de la rate, détectée dans des conditions standardisées.

On entend par conditions standardisées, au sens de la présente invention, des conditions dans lesquelles les paramètres suivants sont sélectionnés :

- ATNC sélectionné,
- voie d'administration de l'ATNC,
- méthode d'isolement de la PrPres à partir de la rate.

Pour une souche sélectionnée dans un animal donné, au stade terminal de la maladie, le titre infectieux est constant.

La détection de la PrPres dans la rate permet d'observer beaucoup plus rapidement les effets des molécules à tester, en particulier l'inhibition de l'accumulation de la PrPres, soit dans les heures qui suivent l'inoculation (capture de l'inoculum par la rate et détection d'un pic de PrPres, entre t_A et $t_A + 2$ jours), soit entre t_B et t_C (PrPres néosynthétisée) : la détection de la PrPres néosynthétisée est possible dans la rate entre 5 et 15 jours après l'infection (t_B) ; par exemple, lorsque l'ATNC correspond à la souche murine C506M3 inoculée par voie intrapéritonéale, chez la souris C57BL/6, la PrPres néosynthétisée peut être détectée dans environ 60 % des cas, dès le 5^{ème} jour post-infection (p.i.) (t_B) et dans 100 % des cas dès le 7^{ème} jour et un plateau est observé à partir du 30^{ème} jour p.i. (t_C).

Une telle méthode permet donc de sélectionner des molécules capables d'empêcher l'accumulation de PrPres ; de telles molécules sont considérées comme présentant une action thérapeutique dans le traitement des ESST.

Conformément à l'invention :

* à l'étape a) :

- l'ATNC correspond à une souche primaire (humaine ou animale) ou une souche stabilisée chez l'animal hôte, c'est-à-dire qui présente des caractéristiques stables chez cet animal hôte après plusieurs passages et notamment les caractéristiques suivantes : délai d'apparition de la maladie identique et profil lésionnel iden-

tique au cours des passages chez tous les animaux (degré de vacuolisation de différentes parties du cerveau) ; il correspond à n'importe quelle souche stabilisée dans les conditions précisées ci-dessus, induisant une accumulation précoce de PrPres dans la rate de l'animal hôte, telle que des souches de tremblante ou des souches d'encéphalopathie bovine, notamment les souches de tremblante dénommées Chandler, ME7, 139A (M.E. Bruce et al., *Scrapie strain variation and its implication* dans *Current topics in Microbiology and Immunology : Transmissible Spongiform Encephalopathies, Scrapie, BSE and related Disorders*, 1991, 172, 125-138), C506M3 (C.I. Lasmézas et al., J. Gen. Virol., 1996, 77, 1601-1609) ou 263K (R.H. Kimberlin et al., J. Gen. Virol., 1977, 34, 295-304 et 1978, 39, 487-496) ou les souches de BSE dénommées 4PB1 (C.I. Lasmézas et al., 1996, précité) et 301V (C.F. Farquhar et al., J. Gen. Virol., 1996, 77, 1941-1946) ;

- ledit ATNC est, de préférence administré dans un tampon adapté à la voie d'administration sélectionnée, sous la forme soit d'un homogénat brut de tissu, de préférence de cerveau, soit d'un culot de PrPres, obtenu par centrifugation convenable, à partir d'un homogénat brut de tissu, de préférence de cerveau ;

- ledit ATNC peut être administré par n'importe quelle voie (voie orale, voie parentérale), de préférence par voie intrapéritonéale, à une dose correspondant à un inoculum d'ATNC, compris entre 0,001 % et 10 % (poids/volume) (DL_{50} comprise entre 10^3 et 10^7) ;

- ledit animal de laboratoire est de préférence un rongeur, notamment la souris ou le hamster.

*** à l'étape b) :**

- la substance à cribler est administrée par voie orale ou parentérale ;

- si le traitement est commencé à t_A , c'est-à-dire simultanément à l'administration de l'ATNC, le modèle selon l'invention permet d'étudier à la fois l'action de la substance à cribler sur l'ATNC, avant qu'il n'ait atteint ses cellules cibles dans la rate et en cours de répllication au niveau de ses cellules cibles, alors que si le traitement est commencé entre t_B et t_C , (c'est-à-dire lorsque la PrPres dans la rate est constamment détectable), le modèle selon l'invention permet d'étudier uniquement l'action de la substance à cribler sur l'ATNC inoculé en cours de répllication au niveau de sa cible.

*** à l'étape d) :**

- selon la séquence d'étapes sélectionnées parmi les techniques d'isolement des protéines connues, à savoir les méthodes basées sur la taille moléculaire, telle que la centrifugation, les méthodes basées sur les différences de solubilité
5 telles que la dissolution par les sels (*salting-in*) et le relargage (*salting-out*) ou le fractionnement par des solvants ou les méthodes basées sur la charge électrique, le degré de purification et le rendement seront différents. Dans le cadre de la présente invention, il est nécessaire de sélectionner une méthode fiable et sensible, permettant d'obtenir un
10 seuil de détection tel que le rapport taux maximal détectable dans la rate/valeur seuil (*cut off*) soit le plus élevé possible, de préférence supérieur à 2 ou tel que lorsqu'on l'on réalise une dilution au 1/2 de l'échantillon final obtenu, on obtient encore un signal de détection ;

- des séquences d'étapes préférées sont décrites ci-après : elles ont l'avantage, sur les procédés d'isolement antérieurement décrits, de présenter une
15 grande fiabilité et une grande sensibilité, du fait que l'extraction proprement dite ne comprend qu'une seule étape de séparation et du fait de la sélection particulière de la séquence d'étapes, alors que dans les procédés antérieurement décrits (R.E. Race et al., J. Gen. Virol., 1992, 73, 3319-3323 ; Doi et al., J. Gen. Virol., 1988, 69, 955-960 ; T. Muramoto et al., Am. J. Pathol., 1993, 143, 5 1470-1479 ; Farquhar C.F. et al., Gen.
20 Virol., 1994, 75, 495-504 et J. Gen. Virol., 1996, 77, 1941-1946 ; Grathwohl K.U.D. et al., Arch. Virol., 1996, 141, 1863-1874), l'extraction comprend plusieurs étapes de séparation et conduit à une imprécision pour ce qui concerne la quantification et/ou ces procédés présentent une sensibilité insuffisante pour obtenir un seuil de détection et une quantification fines et notamment pour effectivement détecter une variation impor-
25 tante du taux de PrPres.

*** à l'étape e) :**

- la PrPres est notamment détectée par immunoessai (Western blot par exemple).

La présente invention a également pour objet un procédé d'isolement
30 de la PrPres, à partir d'un organe ou d'un tissu, notamment la rate ou le cerveau, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes suivantes :

(i) homogénéisation d'organe ou de tissu, prélevés après le sacrifice de l'animal, par broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation, suivi d'un calibrage de l'homogénat, pour l'obtention d'un homogénat comprenant, en poids/volume, de 5 à 50 % dudit organe ou tissu ;

5 (ii) extraction spécifique de la PrPres comprenant une seule étape de séparation, par traitement de l'homogénat obtenu à l'étape (i) par incubation de la suspension obtenue avec une protéase et un détergent (agent surfactif) anionique, apte à favoriser l'agrégation de la PrPres, tel que du sarkosyl (lauroyl sarcosine) à 10-30 % dans un tampon convenable et séparation de la PrPres, par ultracentrifugation unique à
10 240 000-300 000 g pendant 2 à 4 h, de préférence à 20-22°C, de la suspension obtenue, déposée sur un coussin de tampon ayant une densité comprise entre 1,02 et 1,08, à 20°C et récupération du culot de centrifugation comprenant ladite PrPres ; et, si nécessaire,

(iii) purification de la PrPres par mise en suspension du culot de
15 centrifugation obtenu en (ii) dans un tampon de Laemmli comprenant du SDS à 1-5 %, incubation dans ce tampon à 100°C pendant 2-10 minutes et centrifugation à 12 000-15 000 g pendant 10-15 minutes à 16-22°C.

Ladite PrPres ainsi purifiée peut ensuite être séparée par toute technique appropriée telle qu'une électrophorèse (électrophorèse sur gel de poly-
20 acrylamide, par exemple) ou une immunocapture, à partir du surnageant de centrifugation.

Conformément à ce procédé, le tampon d'homogénéisation de l'étape (i) est notamment un tampon neutre tel que de l'eau ou un tampon isotonique tel que du glucose à 5%.

25 Également conformément à l'invention, lors de l'étape (ii) d'extraction, l'ultracentrifugation est réalisée après dépôt de la suspension contenant la PrPres sur un coussin de saccharose à 6-20 %.

En variante, la présente invention a également pour objet un procédé, dans lequel l'extraction comprend une seule étape pour la séparation de la PrPres, et ne
30 nécessite pas d'ultracentrifugation ; un tel procédé d'isolement de la PrPres, à partir d'un organe ou d'un tissu, notamment la rate ou le cerveau est caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes suivantes :

(i) homogénéisation d'organe ou de tissu, prélevés après le sacrifice de l'animal, par broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation, puis addition à l'homogénat obtenu, d'un sel ayant une force ionique élevée et apte à favoriser l'agrégation de la PrPres, tel que du NaCl à 10-30 %, dans un rapport 1:1 (v/v), suivi
 5 d'un calibrage de l'homogénat, pour l'obtention d'un homogénat comprenant, en poids/volume, de 5 à 50 % dudit organe ou tissu ;

(ii) extraction spécifique de la PrPres par traitement de l'homogénat obtenu à l'étape (i) par incubation de la suspension obtenue avec une protéase et un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres, tel que du sarkosyl à 10-
 10 30 % et séparation unique de la PrPres, par centrifugation à 25 000-30 000 g pendant 1-2 heures, de préférence à 16-22°C, de la suspension obtenue, déposée sur un coussin de tampon ayant une densité comprise entre 1,02 et 1,08, à 20°C et récupération du culot de centrifugation comprenant ladite PrPres ; et, si nécessaire

(iii) purification de la PrPres par mise en suspension du culot de
 15 centrifugation obtenu en (ii) dans un tampon de Laemmli comprenant du SDS à 1-5 %, incubation dans ce tampon à 100°C pendant 2-10 minutes et centrifugation à 12 000-15 000 g pendant 10-15 minutes à 16-22°C.

Ladite PrPres ainsi purifiée peut ensuite être séparée par toute technique appropriée telle qu'une électrophorèse (électrophorèse sur gel de poly-
 20 acrylamide, par exemple) ou une immunocapture, à partir du surnageant de centrifugation.

Conformément à ce procédé, le tampon d'homogénéisation de l'étape (i) est notamment un tampon neutre tel que de l'eau ou un tampon isotonique tel que du glucose à 5% ;

25 Également conformément à l'invention :

lors de l'étape (ii) d'extraction, la solution mise en œuvre pour l'extraction comprend un détergent anionique, apte à favoriser l'agrégation de la PrPres et un détergent ayant des propriétés de renaturation des protéines, tel qu'un détergent zwitterionique, comme une sulfobétaïne, de préférence la sulfobétaïne SB 3-
 30 14 à 1-2 %, dans un rapport 1:1 (v/v) ;

lors de l'étape (ii) d'extraction, mais préalablement à la centrifugation, au moins un inhibiteur des protéases est ajouté ;

la centrifugation selon l'étape (ii) d'extraction est, de préférence, réalisée après dépôt de la suspension contenant la PrPres sur un coussin de saccharose à 6-20 % ou un coussin de saccharose à 6-20 % et d'une sulfobétaïne.

La PrPres peut ensuite être détectée par toute méthode spécifique
5 appropriée.

De manière surprenante, ces procédés d'isolement de la PrPres, à partir de la rate, comprenant une extraction en seule étape (→ une précipitation + une séparation), n'entraînent pas de perte cumulative de PrPres et sont directement utilisables sans modification, pour extraire la PrPres de n'importe quel autre tissu.

10 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre le protocole mis en oeuvre dans une méthode de
15 criblage selon l'invention ;

- la figure 2 représente un gel de polyacrylamide montrant l'inhibition de l'accumulation de la PrPres dans les rates de souris infectées par la souche C506M3 et traitées par l'amphotéricine B (AmB) (l'échelle des poids moléculaires a été établie avec des marqueurs précolorés Amersham) ;

20 - la figure 3, sous la forme d'un histogramme, illustre l'inhibition de l'accumulation de la PrPres, chez la même souris, après traitement par l'amphotéricine B ou l'ABLC® (*AmB Lipid Complex*), par rapport à un animal contrôle négatif, traité par un placebo et dans lequel il n'y a pas d'inhibition de ladite accumulation ;

- les figures 4 et 5 illustrent la cinétique d'accumulation de la PrPres
25 dans la rate de souris C57BL/6 inoculées i.p. par la souche C506M3 (0-28 jours post-inoculation) ;

- la figure 6 illustre le rôle de la composition du tampon d'extraction, dans le rendement de purification de la PrPres ;

30 - la figure 7 illustre l'accumulation à 70 jours post-inoculation de la PrPres dans la rate de hamsters infectés par voie intracérébrale et traités pendant 6 jours post-infection par l'AmB (1 mg/kg), un dérivé de l'AmB (MS-8209) et l'ABLC® (10 mg/kg).

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Étude de l'accumulation de la PrPres dans des rates de souris
 5 C57BL/6, infectées par voie intrapéritonéale (ip) par la souche C506M3 et traitées pendant 1 ou 2 semaines (6 jours/semaine), à partir de t_A+15 après l'inoculation, par l'amphotéricine B (AmB) et ses dérivés ; isolement de la PrPres présente dans la rate par le procédé d'isolement comportant une ultracentrifugation, tel que décrit ci-dessus.

10 . étape a) de la méthode de criblage : inoculation
 à t_A , des souris C57BL/6 sont inoculées par voie intrapéritonéale avec 100 μ l d'homogénat de cerveau à 2 % dans du glucosé 5 %, d'une souris infectée au stade terminal de la tremblante expérimentale (souche C506M3).

. étape b) de la méthode de criblage : administration d'une substance
 15 susceptible d'avoir une action thérapeutique ou administration d'un placebo
 à t_A+15 jours (\rightarrow délai compris entre t_B et t_C), les souris C57BL/6 sont réparties en différents lots et sont traitées :

- soit avec de l'amphotéricine B, à raison de 1 mg/kg (AmB),
 - soit avec de l'ABLC[®], à raison de 10 mg/kg, pendant 6 jours (1) ou
 20 12 jours (2), conformément à la figure 1,
 - soit avec un placebo.

. étape c) de la méthode de criblage : sacrifice des animaux.
 À t_A+21 jours (\rightarrow délai compris entre t_B et t_C) ou à t_A+28 jours (\rightarrow à environ t_C), les souris sont sacrifiées par rupture des vertèbres cervicales ; les rates sont
 25 immédiatement prélevées, conformément à la figure 1, et soit stockées à -80°C , soit utilisées extemporanément.

. étape d) de la méthode de criblage : isolement de la PrPres
 Les rates prélevées sont broyées et homogénéisées à 10 %
 (poids/volume) dans une solution de glucose à 5 %. L'homogénat obtenu est calibré,
 30 par passage dans une seringue convenable.

L'homogénat à 10 % (200 µl) est ensuite traité à la protéinase K (10 µg/ml), à 37°C, pendant une heure ; la digestion est bloquée à l'aide de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) 5 mM. Après addition de sarkosyl à 20 % dans du Tris pH 7,4 10 mM, les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à température
 5 ambiante. Ils sont ensuite centrifugés à 245 000 g pendant 4 heures à 20°C, sur un coussin de saccharose à 10 % (100-300 µl) (ultracentrifugeuse Beckman TL100).

Les culots sont remis en suspension dans un tampon de Laemmli, incubés 5 minutes à 100°C, puis les échantillons obtenus sont soumis à une centrifugation à 15 000 g, pendant 15 minutes à 16°C.

10 . étape e) de la méthode de criblage selon l'invention : détection de la PrPres dans les échantillons.

Les échantillons obtenus sont utilisés pour réaliser une électrophorèse SDS-PAGE (gel de polyacrylamide à 12 % chargé avec l'équivalent de 10 mg de rate) et transféré sur membrane de nitrocellulose, dans les conditions décrites par Towbin et
 15 al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354) ou par C.I. Lasmézas et al. (J. Gen. Virol., 1996, précité). L'immunodétection de la PrPres a été réalisée avec l'antisérum 007 JB, dirigé contre le peptide 90-108 de la PrP murine au 1/2500) et des Ig de chèvre anti-lapin conjuguées à de la peroxydase (1/2500). L'immunoréactivité est
 20 révélée par chemiluminescence (ECL, Amersham), quantifiée et visualisée sur films autoradiographiques, comme illustré sur la figure 2 , pour les animaux non traités et les animaux traités pendant 6 jours par l'AmB à 1 mg/kg et sacrifiés à t_A+28 jours, c'est-à-dire une semaine après la fin du traitement.

Les anticorps sont obtenus par couplage dudit peptide (Néosystem, Strasbourg) à la KLH, puis injection sous-cutanée dans la région dorsale de lapins
 25 « Nouvelle-Zélande » d'une émulsion comprenant ledit peptide couplé et de l'adjuvant complet de Freund.

* étape f) de la méthode de criblage selon l'invention : sélection de la substance criblée

La figure 3 illustre les résultats obtenus pour les animaux non traités,
 30 les animaux traités par l'AmB, 1 mg/kg sacrifiés à t_A+21 ou à t_A+28 et les animaux traités par l'ABLC® 6 jours (1) ou 12 jours (2) et sacrifiés à t_A+21 ou à t_A+28 : aussi bien pour les animaux traités par l'AmB que par l'ABLC®, on observe une inhibition

significative de l'accumulation de PrPres ; pour construire l'histogramme, les quantités de PrPres détectées dans la rate sont rapportées à une gamme linéaire de dilutions de PrPres purifiée selon le même procédé que celui décrit ci-dessus, à partir d'un homogénat de cerveau d'animaux au stade terminal de la maladie.

5 Les figures 4 et 5 illustrent la cinétique d'accumulation de la PrPres dans la rate de souris C57BL/6, inoculées par la souche C506M3 à t_A , dans les mêmes conditions que ci-dessus, pendant 28 jours et non traitées : on observe une augmentation progressive jusqu'à t_A+30 (\rightarrow à t_C) ; un plateau est observé à partir de t_A+30 .

EXEMPLE 2 : Étude de l'accumulation de la PrPres dans des rates de souris
 10 **C57BL/6, infectées par voie intrapéritonéale (ip) par la souche C506M3 et traitées pendant 1 ou 2 semaines (6 jours/semaine), à partir de t_A+15 après l'inoculation, par l'amphotéricine B (AmB) et ses dérivés ; isolement de la PrPres par le procédé ne comportant pas d'ultracentrifugation.**

Les étapes a), b), c), e) et f) sont identiques à celles de l'exemple 1.

15 L'étape d) d'isolement de la PrPres à partir des rates de souris est réalisée comme suit :

Les rates prélevées sont broyées et homogénéisées à 20 % (poids/volume) dans une solution contenant du glucose à 5 % ; on ajoute à 200 μ l d'homogénat, 200 μ l de NaCl à 20 % (1:1, v/v). L'homogénat obtenu est calibré, par
 20 passage dans une seringue convenable.

On ajoute à 200 μ l d'homogénat à 20 %, 200 μ l de détergent (sarkosyl à 20 % et sulfobétaïne à 2 % (SB3.14 Calbiochem)) et de la protéinase K à 10 μ g/ml, puis on incube à 37°C, pendant une heure.

Les échantillons sont ensuite centrifugés à 30 000 g pendant 2 heures
 25 à 22°C, sur 200 μ l d'un coussin comprenant du saccharose à 10 % et de la sulfobétaïne à 0,1 %, en concentrations finales (rotor Eppendorf ; centrifugeuse ALC 4239R).

La figure 6 illustre les rendements de purification obtenus avec différentes compositions de tampons d'extraction (représentation sous la forme d'un histogramme et d'un Western blot) : 1 : témoin de rendement (homogénat total) ; 2 :
 30 sarkosyl à 10 %/NaCl à 10 %/Tris 10 mM/SB3-14 à 1 % ; 3 : sarkosyl à 10 %/NaCl à 10 %/Tris 10 mM ; 4 : sarkosyl à 10 %/NaCl à 10 % ; 5 : sarkosyl à 10 %.

Les culots sont remis en suspension dans un tampon de Laemmli, incubés 5 minutes à 100°C, puis les échantillons obtenus sont soumis à une deuxième centrifugation à 15 000 g, pendant 15 minutes à 16°C.

EXEMPLE 3 : Etude de l'accumulation de la PrPres dans des rates d'hamsters

5 syriens dorés infectés par voie intracérébrale par la souche 263K et traités pendant 6 jours, à partir de t_A par l'amphotéricine B et ses dérivés.

étape a) de la méthode de criblage : inoculation

à t_A , des hamsters syriens dorés sont inoculés par voie intracérébrale avec 50 µl d'homogénat de cerveau à 1 % dans du glucosé 5 %, d'un hamster infecté
10 au stade terminal de la tremblante expérimentale [souche 263K (R.H. Kimberlin et al., J. Gen. Virol., 1977, 34, 295-304)].

étape b) de la méthode de criblage : administration d'une substance susceptible d'avoir une action thérapeutique

à t_A , les hamsters syriens dorés sont répartis en différents lots :

15 - non traités

- et traités :

soit avec de l'amphotéricine B, à raison de 1 mg/kg (AmB),

soit avec du MS-8209 ou de l'ABLC®, à raison de 10 mg/kg,

pendant 6 jours.

20 étape c) de la méthode de criblage : sacrifice des animaux.

À t_A+70 jours (date d'apparition des premiers signes cliniques chez les témoins infectés non traités), les hamsters sont sacrifiés par rupture des vertèbres cervicales ; les rates sont immédiatement prélevées.

étape d) de la méthode de criblage : isolement de la PrPres

25 identique à l'étape d) de l'exemple 2.

étape e) de la méthode de criblage selon l'invention : détection de la PrPres dans les échantillons.

Les échantillons obtenus sont utilisés pour réaliser une électrophorèse SDS-PAGE (gel de polyacrylamide à 12 % chargé avec l'équivalent de 10 mg de rate)
30 et transféré sur membrane de nitrocellulose, dans les conditions décrites par Towbin et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354) ou par C.I. Lasmézas et al. (J. Gen. Virol., 1996, précité). L'immunodétection de la PrPres a été réalisée avec

l'anticorps 3F4 au 1/50 000ème, commercialisé par Senetek, Maryland Heights USA et distribué par Clinisciences, Montrouge, France et des Ig de chèvre anti-souris conjuguées à de la peroxydase (1/2500). L'immunoréactivité est révélée par chemiluminescence (ECL, Amersham), quantifiée et visualisée sur films autoradiographiques, comme illustré sur la figure 7, pour les animaux non traités et les animaux traités pendant 6 jours par l'AmB à 1 mg/kg, le MS-8209 à 10 mg/kg et l'ABLC® à 10 mg/kg et sacrifiés à t_A+70 jours.

La partie droite de la figure correspond à une gamme étalon : dilutions de PrPres de cerveau de hamster au stade terminal de la maladie, au 1/4000, 1/2000, 1/1000 et 1/500 ; elle permet de quantifier la PrPres et donc d'établir un histogramme, qui fournit des éléments de comparaison entre les animaux négatifs et les animaux traités (quantification particulièrement sensible).

* étape f) de la méthode de criblage selon l'invention : sélection de la substance criblée

La figure 7 illustre les résultats obtenus ; on observe une inhibition significative de l'accumulation de PrPres : de manière similaire pour les animaux traités avec MS-8209 à 10 mg/kg et l'ABLC® et de manière légèrement moindre avec l'AmB.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDECATIONS

1°) Méthode de criblage de substances, susceptibles d'avoir une action thérapeutique dans le traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST), caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

5 a) inoculation au moment t_A , à au moins un animal de laboratoire, par toute voie appropriée, d'un agent transmissible non conventionnel (ATNC) ;

b) administration audit animal de laboratoire, par toute voie appropriée, soit d'une substance à cribler (animal test), soit d'un placebo (animal contrôle négatif), dans un délai compris entre t_A-15 jours et t_C , correspondant au moment où le
10 taux de PrPres dans la rate dudit animal de laboratoire est maximal ou dans un délai compris entre t_B , correspondant au moment de la première détection de PrPres dans la rate dudit animal de laboratoire et t_C ;

c) sacrifice des animaux dans un intervalle de temps compris entre t_B et t_C , de préférence à t_C et prélèvement de la rate, t_A , t_B et t_C étant exprimés en jours ;

15 d) isolement de la PrPres à partir de chaque rate prélevée selon un procédé d'isolement convenable comprenant l'homogénéisation de la rate, suivie d'un traitement de l'homogénat obtenu pour extraire et éventuellement purifier la PrPres, à partir de ladite rate ;

e) semi-quantification de la PrPres obtenue à l'étape (d) par détection
20 de ladite PrPres par toute méthode appropriée, produisant un signal spécifique, suivie d'une comparaison du signal obtenu avec une gamme étalon de dilutions d'un contrôle positif constitué d'un homogénat de cerveau d'un animal au stade terminal de la maladie ; et

f) sélection de la substance criblée comme candidat au traitement des
25 encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, si le taux de PrPres obtenu dans la rate de l'animal test, à l'étape e) est diminué d'au moins un facteur 2, par rapport au taux obtenu dans les mêmes conditions avec l'animal contrôle négatif.

2°) Méthode de criblage selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'à l'étape a), ledit ATNC est, de préférence administré dans un tampon adapté à la
30 voie d'administration sélectionnée, sous la forme soit d'un homogénat brut de tissu, de préférence de cerveau, soit d'un culot de PrPres, obtenu par centrifugation convenable, à partir d'un homogénat brut de tissu, de préférence de cerveau.

3°) Méthode de criblage selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'à l'étape a), ledit ATNC est administré par voie intrapéritonéale, à une dose correspondant à un inoculum d'ATNC, compris entre 0,001 % et 10 % (poids/volume) (DL_{50} comprise entre 10^3 et 10^7).

5 4°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'à l'étape a), ledit animal de laboratoire est de préférence un rongeur.

10 5°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'à l'étape d), ladite méthode d'isolement est sélectionnée de telle sorte que le rapport taux maximal détectable dans la rate/valeur seuil (*cut off*) est supérieur à 2 ou qu'une dilution au $\frac{1}{2}$ de l'échantillon final obtenu fournit toujours un signal de détection.

15 6°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'à l'étape d), ladite méthode d'isolement de la PrPres comprend une séparation en une seule étape.

7°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'à l'étape e), la PrPres est détectée par immunoessai.

20 8°) Procédé d'isolement de la PrPres, à partir d'un organe ou d'un tissu, notamment la rate ou le cerveau, apte à être mis en œuvre dans une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes suivantes :

25 (i) homogénéisation d'organe ou de tissu, prélevés après le sacrifice de l'animal, par broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation, suivi d'un calibrage de l'homogénat, pour l'obtention d'un homogénat comprenant, en poids/volume, de 5 à 50 % dudit organe ou tissu ;

30 (ii) extraction spécifique de la PrPres comprenant une seule étape de séparation, par traitement de l'homogénat obtenu à l'étape (i) par incubation de la suspension obtenue avec une protéase et un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres dans un tampon convenable et séparation de la PrPres, à partir de la suspension ainsi obtenue, par ultracentrifugation unique à 240 000-300 000 g pendant 2 à 4 h, de préférence à 20-22°C, de ladite suspension, déposée sur un

coussin de tampon ayant une densité comprise entre 1,02 et 1,08, à 20°C et récupération du culot de centrifugation comprenant ladite PrPres ; et, si nécessaire,

(iii) purification de la PrPres par mise en suspension du culot de centrifugation obtenu en (ii) dans un tampon de Laemmli comprenant du SDS à 1-5 %, incubation dans ce tampon à 100°C pendant 2-10 minutes et centrifugation à 12 000-15 000 g pendant 10-15 minutes à 16-22°C.

9°) Procédé d'isolement de la PrPres, à partir d'un organe ou d'un tissu, notamment la rate ou le cerveau, apte à être mis en œuvre dans une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes suivantes :

(i) homogénéisation d'organe ou de tissu, prélevés après le sacrifice de l'animal, par broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation, puis addition à l'homogénat obtenu, d'un sel ayant une force ionique élevée et apte à favoriser l'agrégation de la PrPres, dans un rapport 1:1 (v/v), suivi d'un calibrage de l'homogénat, pour l'obtention d'un homogénat comprenant, en poids/volume, de 5 à 50 % dudit organe ou tissu ;

(ii) extraction spécifique de la PrPres par traitement de l'homogénat obtenu à l'étape (i) par incubation de la suspension obtenue avec solution comprenant une protéase et un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres et séparation unique de la PrPres, par centrifugation à 25 000-30 000 g pendant 1-2 heures, de préférence à 16-22°C, de la suspension obtenue, déposée sur un coussin de tampon ayant une densité comprise entre 1,02 et 1,08, à 20°C et récupération du culot de centrifugation comprenant ladite PrPres ; et, si nécessaire

(iii) purification de la PrPres par mise en suspension du culot de centrifugation obtenu en (ii) dans un tampon de Laemmli comprenant du SDS à 1-5 %, incubation dans ce tampon à 100°C pendant 2-10 minutes et centrifugation à 12 000-15 000 g pendant 10-15 minutes à 16-22°C.

10°) Procédé selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce que le tampon d'homogénéisation de l'étape (i) est notamment un tampon neutre tel que de l'eau ou un tampon isotonique tel que du glucose à 5%.

11°) Procédé selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce qu'à l'étape (ii), préalablement à la centrifugation, au moins un inhibiteur des protéases est ajouté.

5 12°) Procédé selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce qu'à l'étape (ii), la centrifugation est, de préférence, réalisée après dépôt de la suspension contenant la PrPres sur un coussin de saccharose à 6-20 %.

10 13°) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que lors de l'étape (ii) d'extraction la solution mise en œuvre pour l'extraction comprend un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres et un détergent zwitterionique, tel qu'une sulfobétaïne, de préférence la sulfobétaïne SB 3-14 à 1-2 %, dans un rapport 1:1 (v/v).

15 14°) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'à l'étape (ii) d'extraction, la centrifugation est, de préférence, réalisée après dépôt de la suspension contenant la PrPres, sur un coussin comprenant en mélange du saccharose à 6-20 % et une sulfobétaïne.

15°) Application d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 14 à la détection de la PrPres dans un organe ou un tissu.

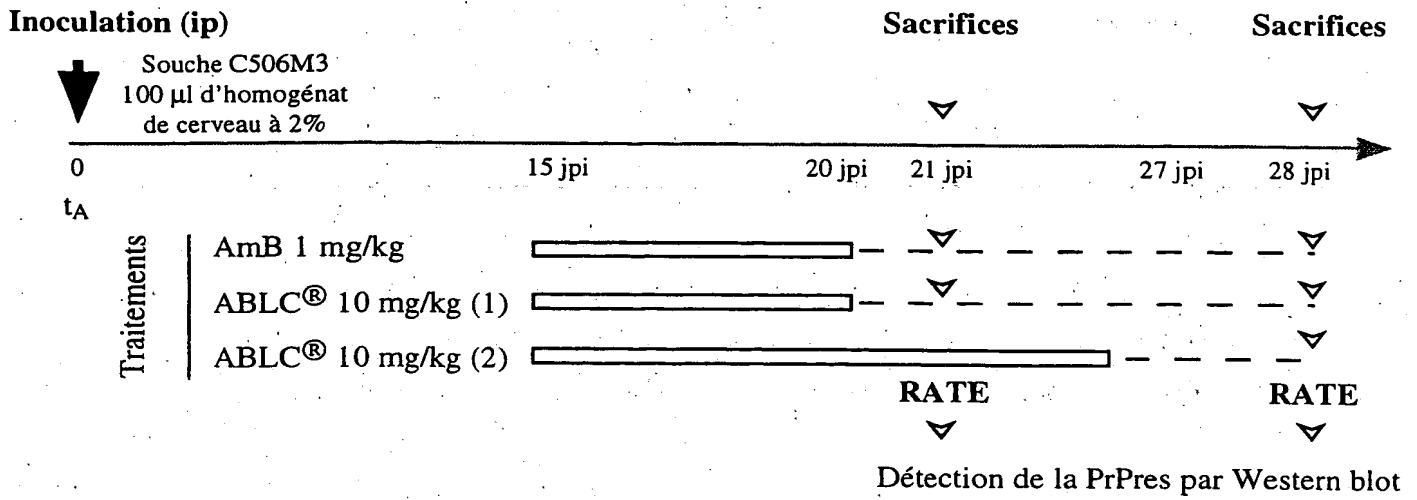


FIGURE 1

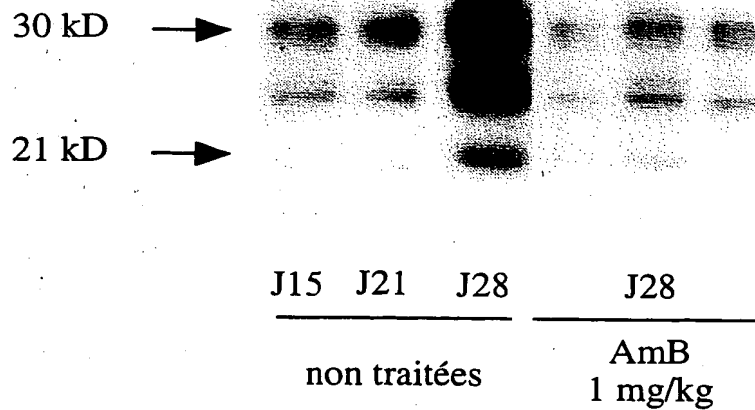


FIGURE 2

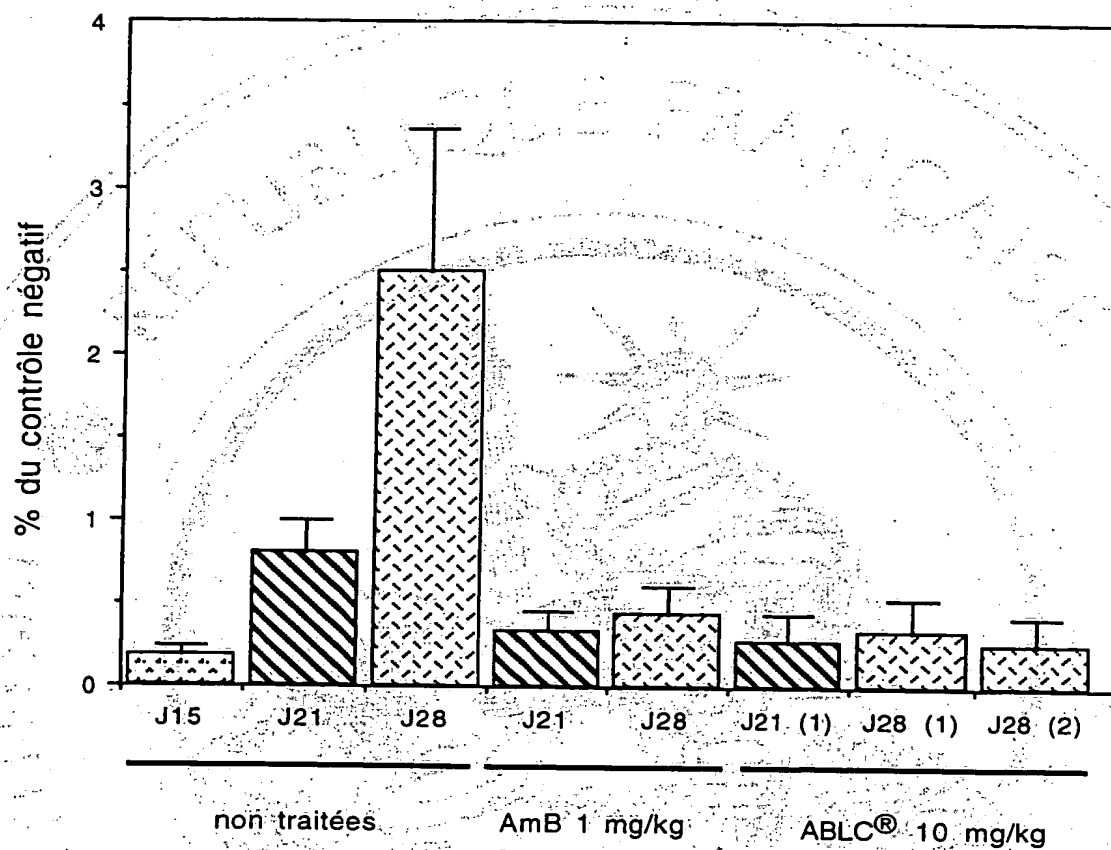


FIGURE 3

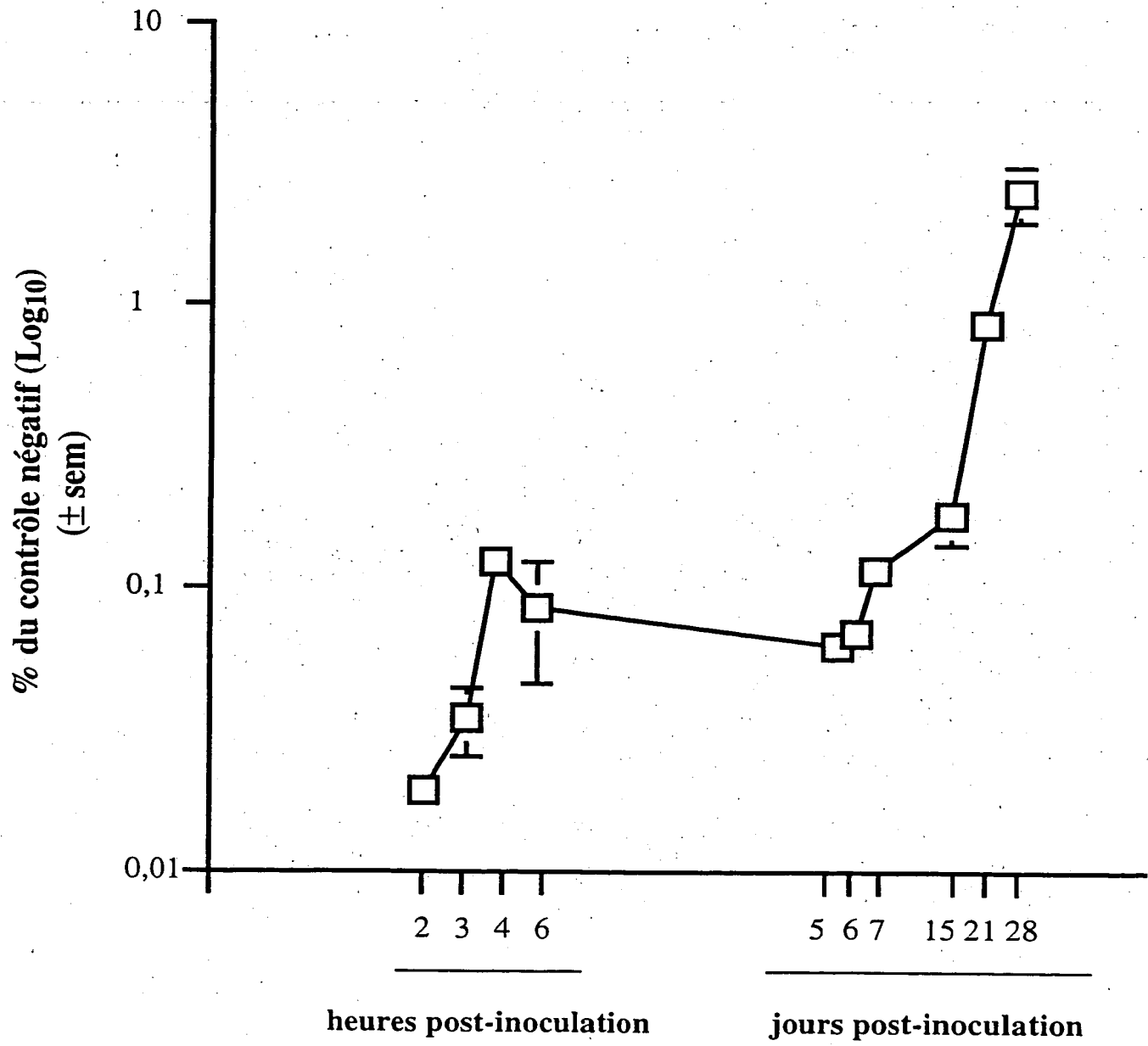
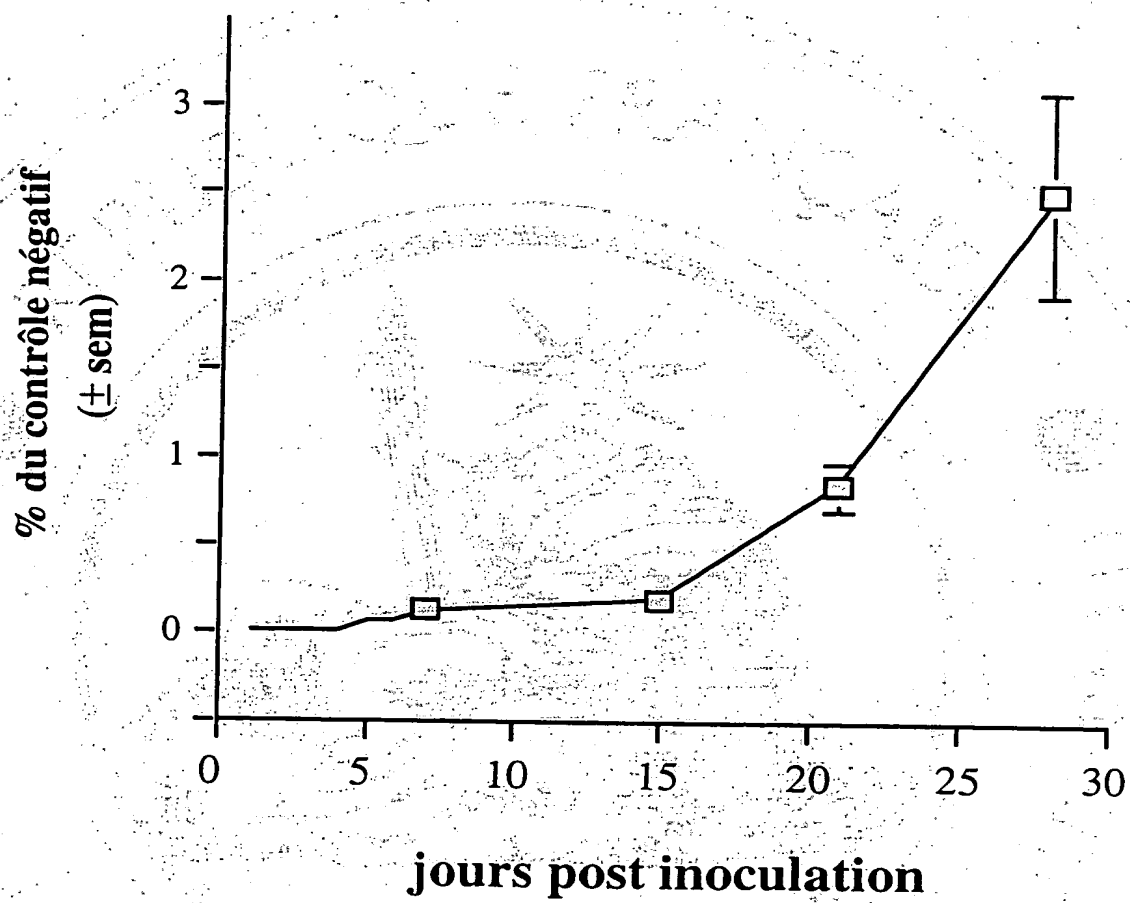


FIGURE 4

**FIGURE 5**

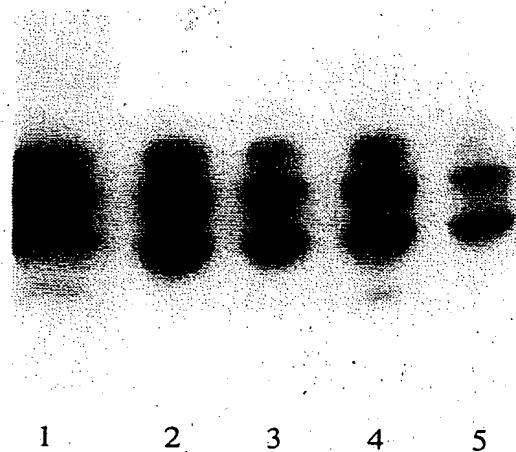
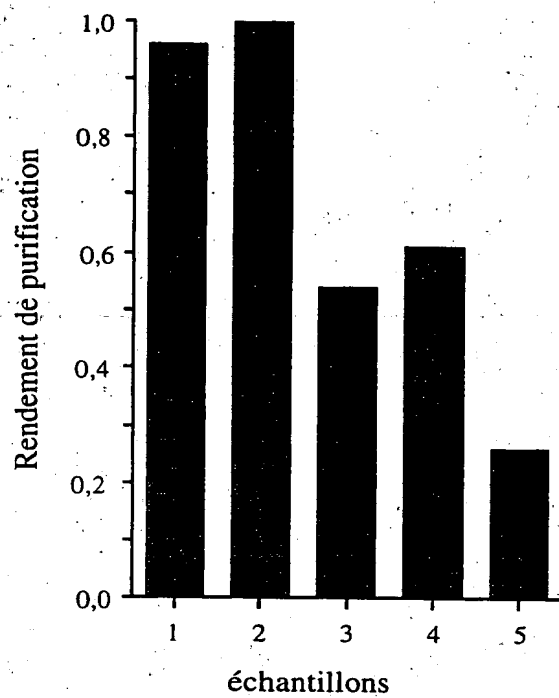


FIGURE 6

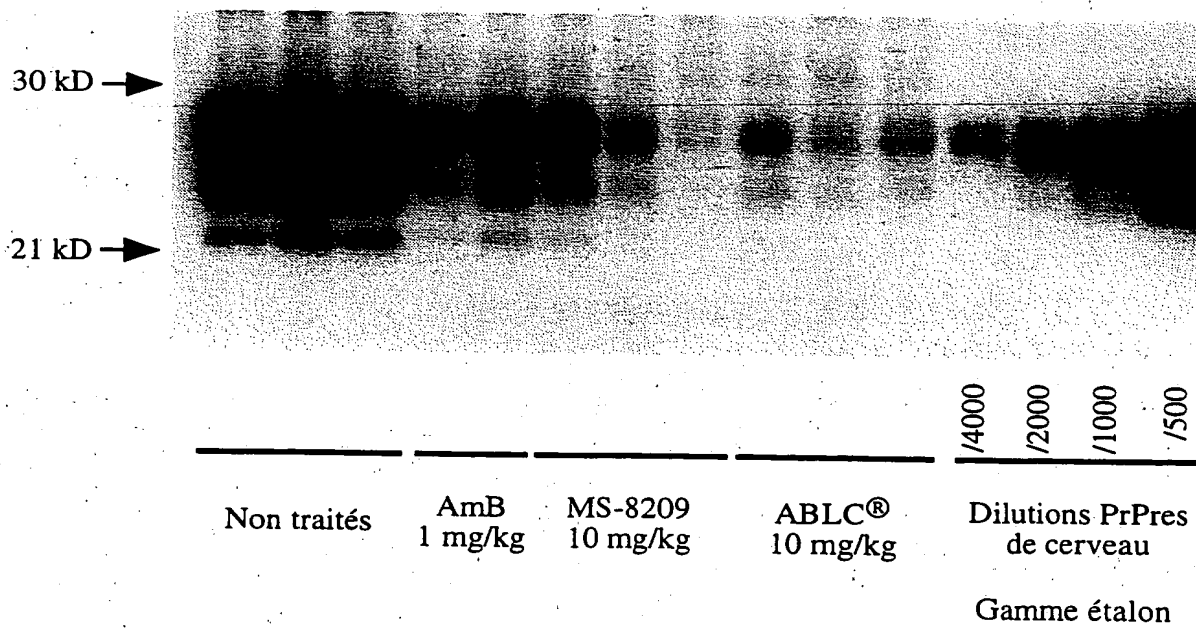


FIGURE 7

REVENDICATIONS

1°) Méthode de criblage de substances, susceptibles d'avoir une action thérapeutique dans le traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST), caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) inoculation au moment t_A , à au moins un animal de laboratoire, par toute voie appropriée, d'un agent transmissible non conventionnel (ATNC) ;

b) administration audit animal de laboratoire, par toute voie appropriée, soit d'une substance à cribler (animal test), soit d'un placebo (animal contrôle négatif), dans un délai compris entre $t_A - 15$ jours et t_C , correspondant au moment où le taux de PrPres dans la rate dudit animal de laboratoire est maximal ou dans un délai compris entre t_B , correspondant au moment de la première détection de PrPres dans la rate dudit animal de laboratoire et t_C ;

c) sacrifice des animaux dans un intervalle de temps compris entre t_B et t_C , de préférence à t_C et prélèvement de la rate, t_A , t_B et t_C étant exprimés en jours ;

d) isolement de la PrPres à partir de chaque rate prélevée selon un procédé d'isolement convenable comprenant l'homogénéisation de la rate, suivie d'une extraction spécifique de la PrPres comprenant une seule étape de séparation, à partir de l'homogénat obtenu et éventuellement la purification de la PrPres ;

e) semi-quantification de la PrPres obtenue à l'étape (d) par détection de ladite PrPres par toute méthode appropriée, produisant un signal spécifique, suivie d'une comparaison du signal obtenu avec une gamme étalon de dilutions d'un contrôle positif constitué d'un homogénat de cerveau d'un animal au stade terminal de la maladie ; et

f) sélection de la substance criblée comme candidat au traitement des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, si le taux de PrPres obtenu dans la rate de l'animal test, à l'étape e) est diminué d'au moins un facteur 2, par rapport au taux obtenu dans les mêmes conditions avec l'animal contrôle négatif.

2°) Méthode de criblage selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'à l'étape a), ledit ATNC est, de préférence administré dans un tampon adapté à la voie d'administration sélectionnée, sous la forme soit d'un homogénat brut de tissu, de préférence de cerveau, soit d'un culot de PrPres, obtenu par centrifugation convenable, à partir d'un homogénat brut de tissu, de préférence de cerveau.

3°) Méthode de criblage selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'à l'étape a), ledit ATNC est administré par voie intrapéritonéale, à une dose correspondant à un inoculum d'ATNC, compris entre 0,001 % et 10 % (poids/volume) (DL_{50} comprise entre 10^3 et 10^7).

4°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'à l'étape a), ledit animal de laboratoire est de préférence un rongeur.

5°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'à l'étape d), ladite méthode d'isolement est sélectionnée de telle sorte que le rapport taux maximal détectable dans la rate/valeur seuil (*cut off*) est supérieur à 2 ou qu'une dilution au $\frac{1}{2}$ de l'échantillon final obtenu fournit toujours un signal de détection.

6°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'à l'étape d), ladite méthode d'isolement de la PrPres comprend une séparation en une seule étape.

7°) Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'à l'étape e), la PrPres est détectée par immunoessai.

8°) Procédé d'isolement de la PrPres, à partir d'un organe ou d'un tissu, notamment la rate ou le cerveau, apte à être mis en œuvre dans une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes suivantes :

(i) homogénéisation d'organe ou de tissu, prélevés après le sacrifice de l'animal, par broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation, suivi d'un calibrage de l'homogénat, pour l'obtention d'un homogénat comprenant, en poids/volume, de 5 à 50 % dudit organe ou tissu ;

(ii) extraction spécifique de la PrPres comprenant une seule étape de séparation, par traitement de l'homogénat obtenu à l'étape (i) par incubation de la suspension obtenue avec une protéase et un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres dans un tampon convenable et séparation de la PrPres, à partir de la suspension ainsi obtenue, par ultracentrifugation unique à 240 000-300 000 g pendant 2 à 4 h, de préférence à 20-22°C, de ladite suspension, déposée sur un

coussin de tampon ayant une densité comprise entre 1,02 et 1,08, à 20°C et récupération du culot de centrifugation comprenant ladite PrPres ; et, si nécessaire,

(iii) purification de la PrPres par mise en suspension du culot de centrifugation obtenu en (ii) dans un tampon de Laemmli comprenant du SDS à 1-5 %, incubation dans ce tampon à 100°C pendant 2-10 minutes et centrifugation à 12 000-15 000 g pendant 10-15 minutes à 16-22°C.

9°) Procédé d'isolement de la PrPres, à partir d'un organe ou d'un tissu, notamment la rate ou le cerveau, apte à être mis en œuvre dans une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement les étapes suivantes :

(i) homogénéisation d'organe ou de tissu, prélevés après le sacrifice de l'animal, par broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation, puis addition à l'homogénat obtenu, d'un sel ayant une force ionique élevée et apte à favoriser l'agrégation de la PrPres, dans un rapport 1:1 (v/v), suivi d'un calibrage de l'homogénat, pour l'obtention d'un homogénat comprenant, en poids/volume, de 5 à 50 % dudit organe ou tissu ;

(ii) extraction spécifique de la PrPres par traitement de l'homogénat obtenu à l'étape (i) par incubation de la suspension obtenue avec solution comprenant une protéase et un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres et séparation unique de la PrPres, par centrifugation à 25 000-30 000 g pendant 1-2 heures, de préférence à 16-22°C, de la suspension obtenue, déposée sur un coussin de tampon ayant une densité comprise entre 1,02 et 1,08, à 20°C et récupération du culot de centrifugation comprenant ladite PrPres ; et, si nécessaire

(iii) purification de la PrPres par mise en suspension du culot de centrifugation obtenu en (ii) dans un tampon de Laemmli comprenant du SDS à 1-5 %, incubation dans ce tampon à 100°C pendant 2-10 minutes et centrifugation à 12 000-15 000 g pendant 10-15 minutes à 16-22°C.

10°) Procédé selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce que le tampon d'homogénéisation de l'étape (i) est notamment un tampon neutre tel que de l'eau ou un tampon isotonique tel que du glucose à 5%.

11°) Procédé selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce qu'à l'étape (ii), préalablement à la centrifugation, au moins un inhibiteur des protéases est ajouté.

12°) Procédé selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce qu'à l'étape (ii), la centrifugation est, de préférence, réalisée après dépôt de la suspension contenant la PrPres sur un coussin de saccharose à 6-20 %.

13°) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que lors de l'étape (ii) d'extraction la solution mise en œuvre pour l'extraction comprend un détergent anionique apte à favoriser l'agrégation de la PrPres et un détergent zwitterionique, tel qu'une sulfobétaïne, de préférence la sulfobétaïne SB 3-14 à 1-2 %, dans un rapport 1:1 (v/v).

14°) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'à l'étape (ii) d'extraction, la centrifugation est, de préférence, réalisée après dépôt de la suspension contenant la PrPres, sur un coussin comprenant en mélange du saccharose à 6-20 % et une sulfobétaïne.

15°) Application d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 14 à la détection de la PrPres dans un organe ou un tissu.